

遺伝子組換え食品等専門調査会における審議状況について

1. 審議状況

厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた「ワタ281系統」及び「ワタ3006系統」に係る食品健康影響評価（平成15年8月1日付け厚生労働省発食安第0801001号）については、平成17年5月30日に開催された遺伝子組換え食品等専門調査会（第27回、座長：早川堯夫）において審議され、結果がとりまとめられた。

また、本審議結果（案）については、幅広く国民に意見・情報を募った後に、食品安全委員会に報告することとなった。

2. 「ワタ281系統」及び「ワタ3006系統」の食品健康影響評価についての意見・情報の募集について

上記品目に係る食品健康影響評価に関する審議結果（案）を、食品安全委員会ホームページ等に公開し、意見・情報を募集する。

1) 募集期間

平成17年7月7日（木）開催の食品安全委員会（第102回会合）終了後、平成17年8月3日（水）までの4週間。

2) 受付体制

電子メール（ホームページ上）、ファックス及び郵送

3) 意見・情報提供等への対応

いただいた意見・情報等を取りまとめ、遺伝子組換え食品等専門調査会の座長の指示のもと、必要に応じて専門調査会を開催し、審議結果を取りまとめ、食品安全委員会に報告する。

遺伝子組換えワタ「ワタ 281 系統」に係る食品健康影響評価に関する審議結果（案）

I はじめに

食品安全委員会は食品安全基本法に基づき、厚生労働省より、遺伝子組換えワタ 281 系統（以下、「ワタ 281 系統」という。）の安全性の審査に係る食品健康影響評価について意見を求められた。（平成 15 年 8 月 1 日、関係書類を接受）

II 評価対象食品の概要

名 称：ワタ 281 系統

性 質：チョウ目害虫抵抗性、グルホシネート除草剤耐性

申請者：ダウ・ケミカル日本株式会社

開発者：マイコジェン・シード／ダウ・アグロサイエンス社

ワタ 281 系統は、害虫（チョウ目昆虫）抵抗性の *cryIF* (synpro : synthetic products の略。以下同じ。) 遺伝子 (*B. t.* 遺伝子) 及び除草剤グルホシネート耐性の改変 *pat* 遺伝子をワタのゲノム中に挿入したものである。

ワタの害虫であるチョウ目のコットンボールワーム、タバコパッドワームの幼虫に対し高い防除効果を示すとともに、除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育することができるワタである。

なお、ワタ 281 系統及びワタ 3006 系統*を既存の育種手法を用いて掛け合わせ、*cryIF* (synpro)、*cryIAC* (synpro) 及び改変 *pat* 遺伝子の 3 つの遺伝子を有する品種(商品名：WideStrike™) を作出、商品化することである。

*ワタ 3006 系統：害虫（チョウ目昆虫）抵抗性の *cryIAC* 遺伝子 (*B. t.* 遺伝子) 及び除草剤グルホシネート耐性の改変 *pat* 遺伝子をワタのゲノム中に挿入して作出された遺伝子組換え系統。

III 食品健康影響評価

第 1 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相違に関する事項

1 宿主及び導入 DNA に関する事項

(1) 宿主の種名及び由来

ワタ 281 系統の宿主として用いられたワタは、Malvales 目、Malvaceae 科、*Gossypium* 属、*hirsutum* 種の GC510 系統である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

ワタ 281 系統に導入された *cryIF* (synpro) 遺伝子は、*Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* 由来であり、植物に導入しやすいよう一部改変されたものである。ワタ 281 系統に導入された、改変 *pat* 遺伝子は、*Streptomyces viridochromogenes* 由来で、植物用に最適化された合成グルホシネート耐性遺伝子である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

cryIF (synpro) 遺伝子はチョウ目害虫を防除するタンパク質をコードする。改変 *pat* 遺伝子はグルホシネート・アンモニウムへの耐性を付与するもので、戻し交雑における選択マーカーとして利用した。これらの遺伝子をアグロバクテリウム法により導入した。

2 宿主の食経験に関する事項

ワタは主に繊維作物として栽培されているが、収穫されたワタの綿実から繊維が除かれ、綿実油が搾油される。宿主の食用としての利用は綿実油のみであり、綿実油は、揚げ油、サラダ油、料理用油、マヨネーズ、サラダドレッシング、マーガリンなどに広く用いられている。綿実油は、日本人の年間総食品消費量のうちの 0.012% を占めている（参考文献 1）。

3 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項

（1）宿主の可食部分の主要栄養素等（タンパク質、脂質等）の種類及びその量の概要

宿主の可食部分である綿実の主要成分組成（乾燥重量%）は、タンパク質 27.6%、脂質 22.6%、灰分 4.0% 及び炭水化物 45.8% である。

（2）宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質（栄養素の吸収等を阻害する物質。例えば、トリプシンインヒビター、フィチン酸等）等の種類及びその量の概要

宿主であるワタには、ゴシポールと呼ばれるテルペノイド物質とシクロプロペン脂肪酸が含まれる。なお、ワタ乾燥種子重量当たりのゴシポールの含有率は、0.19～1.7% であるが（参考文献 2）、ゴシポールは、綿実油の加工過程の加熱及びアルカリ処理で取り除かれる。また、シクロプロペン脂肪酸は、搾油工程における脱臭処理によって綿実油中の含有量が著しく減少する（参考文献 3）。

4 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項

ワタ 281 系統と既存種の食品としての利用は、いずれも綿実油であり、利用方法において差異はない。

（1）収穫時期（成熟程度）と貯蔵方法

戻し交雑に使用した非組換えワタ（商業品種：PSC355 系統）と、ワタ 281 系統について栽培試験を実施し、生育及び形態を記録したところでも、ワタ 281 系統の生育及び形態上の特質は非組換えワタと変わりはない。なお、貯蔵方法においても、組換えワタと非組換えワタで変わりはない。

（2）摂取（可食）部位

ワタ由来の食品は綿実油であり、組換えワタと非組換えワタで変わりはない。

（3）摂取量

食品としての綿実油は、マヨネーズやマーガリン等に使用されているものも含め、日本人の総食品消費量のうち 0.012% を占めている。

（4）調理及び加工方法

ワタ 281 系統と非組換えワタの加工の方法には変わりはない。綿実油は、揚げ油、サラダ油、料理用油、マヨネーズ、サラダドレッシング、マーガリンなどに用いられる。

5 宿主以外のものを比較対象に追加している場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項 宿主以外のものは比較対象としていない。

6 安全性評価において検討が必要とされる相違点

ワタ 281 系統では、*cry1F* (synpro) 遺伝子、改変 *pat* 遺伝子が導入され、Cry1F(synpro) タンパクと PAT タンパクが産生されていることが、宿主との相違点である。

以上、1～6 により、ワタ 281 系統の安全性評価においては、既存のワタとの比較が可能であると判断された。

第2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

ワタ 281 系統に組み込まれた *cry1F* (synpro) 遺伝子は、Cry1F タンパク質を産生し、チョウ目昆虫の幼虫による食害を防止することが可能になる。

さらに、ワタ 281 系統とワタ 3006 系統を交雑し、商品化することにより、さらに幅広くワタ害虫を防除することが可能となるとのことである。

第3 宿主に関する事項

1 分類学上の位置付け（学名、品種名及び系統名等）

宿主には、*Gossypium hirsutum* 種の GC510 系統が用いられた。

2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯

ワタの原産地は、主に熱帯及び亜熱帯の比較的乾燥した地域と考えられている。

今日、一般に栽培されているワタは *Gossypium* 属の 50 種のうち 4 種であり、このうち、*G. hirsutum* L. が最も広く栽培されている。

ワタの育種は、主に綿花の繊維の品質向上のために行われてきた歴史があり、ワタが元来含有するゴシポールとシクロプロペン脂肪酸の生産を低下・消失させるための育種は特別行われてこなかったものと思われる。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

ワタには、ゴシポールと呼ばれるテルペノイド物質、また、シクロプロペン脂肪酸といった有害成分が含まれている。

ワタ種子に含まれるゴシポール及び関連テルペノイド群の含有レベルは、品種及び環境条件により異なっているが、綿実油の加工過程の加熱及びアルカリ処理でゴシポールは取り除かれ、シクロプロペン脂肪酸は、油の脱臭、漂白精製工程により、その含有量は大幅に減少する。

4 アレルギー誘発性に関する事項

ワタについては、ワタを加工する工場の従業員が、ワタくずを吸い込むことにより喘息のような症状が現れることが知られているが（参考文献 4）、食用となる綿実油については、タンパク質を含んでおらず、また、ワタは風媒花ではないため、花粉がアレルギーの原因となる可能性は極めて低い。

5 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項

ワタに感染する植物ウイルスは存在するが、それらのうち、ヒトや動物に感染する能力があるものは知られていない。

6 安全な摂取に関する事項

綿実油の精製方法は一般に種子から種皮を取り除き、種皮の取れた種をローラーで挽き、その後加熱して細胞壁を壊し、油の粘度を低め、綿実油を抽出するとともに、途中の加熱工程でゴシポールが取り除かれている。更なる精製加工過程（脱臭、漂白）でシクロプロペノイド脂肪酸量も減少するため問題とはならない。また、食用となる精製綿実油からは、通常、タンパク質は検出されない（参考文献 5）。

7 近縁の植物種に関する事項

ワタには有害生理活性物質を生産する近縁種は知られていない。

第4 ベクターに関する事項

1 名称及び由来に関する事項

ワタ 281 系統の形質転換に用いられたプラスミドベクター pAGM281 の基となったベクターは、RK2 由来の pDAS 1 である。本ベクターについては、RK2 プラスミド由来のテトラサイクリン耐性遺伝子の代わりに *Streptococcus faecalis* プラスミド pAM beta（参考文献 6）由来のエリスロマイシン耐性遺伝子のコード配列が挿入されている他、RK2 由来の複製基点 Ori 遺伝子と転写抑制遺伝子 *trfA* 及び *Rhizobium radiobacter* (*A. tumefaciens*) 由来の pTi5955（参考文献 7）の T-DNA 境界配列が含まれている。

2 性質に関する事項

pDAS 1 の塩基数は 7,550bp である。また、本ベクターの構成遺伝子の特性も明らかとなっている。

第5 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

1 挿入 DNA の供与体に関する事項

（1）名称、由来及び分類に関する事項

cryIF (synpro) 遺伝子は、*B. thuringiensis* var. *aizawai* 由来の植物用に最適化された遺伝子である。

改変 *pat* 遺伝子は、*S. viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子をもとに合成されたものである。

（2）安全性に関する事項

cryIF (synpro) 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* について、WHO の化学安全国際プログラム (IPCS) による環境健康基準報告書は、「飲料水または食品に存在する *B. t.* 菌がヒトの健康に対する有害性となる記録はない」と結論している。また、ほ乳類の腸細胞表面には、*cryIF* (synpro) 遺伝子にエンコードされたデルタエンドトキシンとの結合部位はないことから、家畜やヒトがこのタンパク質の影響を受けることはない。

改変 *pat* 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* は、土壌に一般に生息する好気性の放線菌であり、極めて軽微なストレプトマイシン感受性を持つが、ヒト、動物及び植物に対する不都合な影響については報告されていない。また、ヒトへの病原性はなく、毒素の産生のようなヒトに対する健康上の影響は知られていない。

2 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む）及びその遺伝子産物の性質に関する事項

（1）挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項

ワタ 281 系統に導入された *cryIF* (synpro) 遺伝子は、*B. thuringiensis* var. *aizawai* 由来で植物用に最適化された。挿入 DNA の遺伝要素は表のとおりであり、制限酵素による切断地図、機能等は明らかとなっている。

・ワタ 281 系統への挿入 DNA

略称	機 能
(4ocs)Delta-Mas2'	pTiAch5 由来のオクトピン合成酵素のエンハンサーを 4 コピー含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) pTi15955 (GenBank Locus ATACH5, Accession number X00491) 由来のマンノピン合成酵素の合成プロモーター。
<i>cryIF</i> (synpro)	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> 由来の植物用に最適化された遺伝子。コアトキシン Cry1F(core)、Cry1Ca3 と Cry1Ab の一部をコードする。
ORF25Poly-A	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) pTi15955 (GenBank Locus ATACH5, Accession number X00491) 由来の双方向ターミネーター。
改変 <i>pat</i>	<i>S. viridochromogenes</i> 由来のフォスフィトリシ・アセチルトランスフェラーゼ 遺伝子配列に基づき、植物用に最適化された合成グルコシネート耐性遺伝子。
UbiZml (イントロン 1)	トウモロコシ <i>Zea mays</i> のユビキチン 1 プロモーター

（2）塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図

ワタ 281 系統に導入しようとする T-DNA の挿入部分の塩基数は 8,014bp であり、制限酵素による切断地図も明らかとなっている。

（3）挿入遺伝子の機能に関する事項

cryIF (synpro) 遺伝子は、ワタの害虫であるチョウ目昆虫を防除するタンパク質をコードしており、改変 *pat* 遺伝子は選抜マーカーとして用いられる除草剤耐性遺伝子である。

（4）抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

T-DNA 領域に抗生物質耐性マーカー遺伝子は含まれていない。なお、発現ベクター pAGM281 に組み込まれたエリスロマイシン耐性遺伝子は、T-DNA 領域外にある。

3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項

（1）プロモーターに関する事項

cryIF (synpro) 遺伝子のプロモーターは、*R. radiobacter*(*A. tumefaciens*) のマンノピン合成酵素及びオクタピン合成酵素プロモーター由来の合成プロモーターである (4ocs)Delta-Mas2' プロモーターである。

改変 *pat* 遺伝子のプロモーターはトウモロコシのユビキチンプロモーターである。

（2）ターミネーターに関する事項

cryIF (synpro) 遺伝子のターミネーターは、*R. radiobacter*(*A. tumefaciens*) のオープンリーディングフレーム 25 (ORF25) による両方向のポリ A 化シグナルである。

改変 *pat* 遺伝子のターミネーターも同じである。

- (3) その他、挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列を組み込んだ場合には、その由来、性質等が明らかであること

上記プロモーター、ターミネーター以外に挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列は導入されていない。

4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

ワタ 281 系統の作出に用いられた発現ベクター pAGM281 は、PK2 由来の T-DNA バイナリープラスミドの T-DNA 境界配列間に、改変 *pat* 遺伝子を発現するための配列（[UbiZm1] – [改変 *pat*]）配列を挿入し、さらに、改変 *pat* 遺伝子と T-DNA 領域境界 B との間に、*cryIF* (synpro) 遺伝子を発現するための配列（[(4ocs)Delta-Mas2'] – [*cryIF* (synpro)] – [ORF25Poly-A]）を挿入して構築された。

5. 構築された発現ベクターに関する事項

- (1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

ワタ 281 系統は、発現ベクター pAGM281 を用いて作出された。

発現ベクター pAGM281 の塩基数は 14,950bp である。また、制限酵素による切断地図は明らかとなっている。

- (2) 原則として、最終的に構築された発現ベクターには、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないこと

構築された発現ベクターには、*CryIF*(synpro) 及び PAT タンパク質以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームは含まれていない。

- (3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が発現ベクター上で明らかであること

ワタ 281 系統は、発現ベクター pAGM281 を用いて、アグロバクテリウム法により作出されたものであるが、*cryIF*(synpro) 及び改変 *pat* 遺伝子のコード配列とともに、ワタにおけるこれら遺伝子の発現に必要な調節要素を含む挿入領域（T-DNA 領域）は、発現ベクター上で明らかとなっている。

- (4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること
発現ベクター pAGM281 の各要素は純化され、T-DNA 領域に目的外の遺伝子は含まない。

6 DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

ワタ 281 系統は、発現ベクター pAGM281 を用い、宿主であるワタ GC510 系統をアグロバクテリウム法によって形質転換したものである。

試験管内で発芽したワタ GC510 系統の子葉部分を、生育 7～10 日目の苗から切り離し、発現ベクター pAGM281 を含む非病原性の *R. radiobacter*(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 株と共に培養した。

共培養の後、処理した子葉部分をグルホシネート・アンモニウムが含まれたカルス形成誘発培地に移した。得られたカルス組織を、さらにグルホシネート・アンモニウムを含む選択培地で培養し、その後、幼胚誘発培地に移して再分化させた。発根した苗木を殺菌土壌に植え替え、環境

順応させるとともに、組換え体の標的害虫（コットンボールワーム）に対する耐性を葉片ディスクを使った生物検定により確認し、ワタ 281 系統を得た。

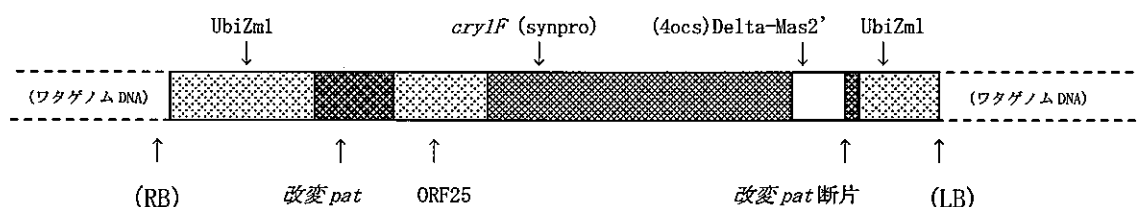
第6 組換え体に関する事項

1 遺伝子導入に関する事項

(1) コピー数及び挿入近傍配列

導入遺伝子のコピー数の解明、各 DNA 配列の構成と挿入を確認するために、サザンブロット分析と挿入 DNA のクローニングおよび塩基配列の決定を行った結果、ワタ 281 系統には、Cry1F(synpro)及び PAT タンパク質を発現する遺伝子カセットの完全な 1 コピーと、改変 *pat* 遺伝子の一部分のコピー 1 断片がワタゲノム中に存在することが示された。形質分離分析により、挿入されたすべての DNA 配列は単一の遺伝子座に分離されていることが示唆された。また、サザンブロット分析により、発現ベクター pAGM281 のバックボーン配列は導入されていないことが確認された。なお、挿入近傍配列も明らかとなっている。

・ワタ 281 系統に挿入された DNA (模式図)



(2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

挿入 DNA 及び隣接境界領域の塩基配列分析により、UbiZml プロモーターと改変 *pat* 遺伝子の断片配列 (231bp) は、完全な PAT タンパク質発現カセットとは逆方向に位置することが確認された。また、実際に挿入された T-DNA 領域の塩基配列は、UbiZml プロモーター領域内で 2 つの塩基が変化していた以外は一致し、この他には、目的とする以外のタンパク質を発現する可能性のある新しいオープンリーディングフレームは同定されなかった。

なお、*pat* 配列の断片が 255bp オープンリーディングフレームの一部を構成しており、改変 *pat* 遺伝子由来の 231bp (N-ターミナル 77aa) 及び隣接する 3' T-DNA 境界領域由来の 24bp (C-ターミナル 8aa) からなる 85 アミノ酸ポリペプチドをエンコードしている可能性がある。UbiZml プロモーターが存在することから、ワタ 281 系統内でこの改変 *pat* 遺伝子断片のオープンリーディングフレームの *in vivo* 転写が起り、分子量 9.7kDa の部分的 PAT タンパク質が産生されている可能性が考えられた。また、RT-PCR 解析の結果、改変 *pat* 遺伝子断片のオープンリーディングフレームの転写量は、全長の 8 分の 1 であることが分かった。さらに、ワタ 281 系統の組織のウェスタンブロット分析の結果、分子量 9.7kDa の部分的 PAT タンパク質は検出されなかった。以上の結果から、仮に、ワタ組織中で部分的 PAT タンパク質が発現したとしても、完全長の改変 *pat* 遺伝子より発現する PAT タンパク質 (分子量 20.7kDa) に比べ僅かであること、また、最終的に食品として利用される精製された綿実油からはタンパク質は検出されないこと等から、安全性に問題はないと判断された。

2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

発現時期と発現量については、Cry1F タンパク質及び PAT タンパク質とも、全ての生育時期における葉、花及び綿実さや中で検出された。

発現部位と発現量については、Cry1F(synpro) タンパク質の平均含有量は、受粉時期のデータでは、花粉中の極微量（検出限界以下）から全ワタ体組織中 22ng/mg(乾燥重量当たり。以下同じ)以上まで幅が広く、種子中の発現量は平均 5.13ng/mg であった。

また、PAT タンパク質は発現量が少なく、蕾検体では検出限界（0.001-0.4ng/mg）以下から 0.79ng/mg の範囲であり、種子中の発現量は平均 0.47 ng/mg であった。なお、PAT タンパク質の発現量は、部位によっては検出限界以下であった。

3 遺伝子産物（タンパク質）が一日タンパク摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項

綿実、種皮、綿実ミール及び精製油について ELISA 分析を行ったところ、Cry1F(synpro) タンパク質及び PAT タンパク質は検出されなかったことから、ワタ 281 系統由来の精製された綿実油や綿実油を含む食品の摂取による Cry1F(synpro) タンパク質及び PAT タンパク質のヒトへの予測される曝露は検出限界以下であることがわかった。

なお、ヒトが摂取するワタ産物は綿実油であり、綿実油中からはタンパク質は検出されない。

4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項

(1) 挿入遺伝子の供与体（抗生物質耐性マーカー遺伝子供与体も含む）のアレルギー誘発性（グルテン過敏性腸炎誘発性を含む）に関する知見が明らかにされていること

cry1F(core) 遺伝子は、*B. thuringiensis* sbsp. var *aizawai* に由来する。*Bacillus thuringiensis* (*B. t.*) は 60 年以上もの間、害虫防除のために使用され、その使用の歴史や哺乳類でのテスト（経口摂取暴露による病原菌のテストを含む）及び伝染病学上の研究により、ヒトへの安全性は確立されている。

改変 *pat* 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* は、土壌に生息する一般的な好気性放線菌の一種である。*Streptomyces* 属菌はヒトの病気の原因になることは少ないが、皮膚及び皮下組織の局所的な慢性的化膿性の感染症に見られることがある。（参考文献 8）

これらの供与体にアレルギー誘発性があるとの報告は知られていない。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）についてそのアレルギー誘発性に関する知見が明らかにされていること

Cry1F(synpro) タンパク質及び PAT タンパク質については、いずれも、ヒトに対するアレルギー誘発性を有するという報告はない。

なお、ヒトが摂取するワタ 281 系統由来の食品は綿実油のみであり、タンパク質はその精製過程において分離され、精製油に含まれることはない。

(3) 遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

遺伝子組換え *Pseudomonas fluorescens* DR1647 株由来の Cry1F(synpro) タンパク質及び *Escherichia coli* 発現システムにより産生された PAT タンパク質を用いて、以下の試験が行われた。

なお、試験に用いられた組換え微生物（DR1647 株）由来の Cry1F(synpro)タンパク質は、アミノ酸配列分析、SDS-PAGE、ウェスタンブロット、N 末端配列解析、MALDI-TOF 質量分析から、ワタ 281 系統に発現する Cry1F(synpro)タンパク質と生化学的、構造的及び機能的に同等であることが確認されている。

①人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理

Cry1F(synpro)タンパク質を、ペプシンを含む人工胃液（SGF）に加え、0～30 分間処理したところ、Cry1F(synpro)タンパク質は SGF 内で 1 分以内に消化された。

また、PAT タンパク質を、ペプシンを含む人工胃液（SGF）に加え、0.5～60 分間処理したところ、PAT タンパク質は 30 秒以内に消化された。

②人工腸液によるアルカリ処理及び酵素（パンクレアチン）処理

Cry1F(synpro)タンパク質を、約 1% (w/v) のパンクレアチンを含む人工腸液（SIF）に加えたところ、Cry1F(synpro)タンパク質は、SIF 中で耐トリプシンのコアトキシンまで速やかに消化されたが、コアトキシンは 4 時間後でも消化されなかった。

また、PAT タンパク質は、パンクレアチンを含む SIF で 30 秒以内に消化されることが明らかにされている（参考文献 9）。

③加熱処理

Cry1F(synpro)タンパク質を 90℃で 30 分間加熱処理し、SDS-PAGE 及び ELISA 法により、分子量及び酵素活性を見たところ、分子量は 90℃、30 分間の加熱で変化しなかったが、酵素活性は 98%以上失活していることが確認された。

また、PAT タンパク質は、90℃で 60 分加熱処理しても、分子量に変化がないことが明らかにされているが（参考文献 9）、50℃で 10 分間の加熱処理により酵素活性が失活することが確認されている（参考文献 10）。

（4）遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲン（グルテン過敏性腸疾患に関与するタンパク質を含む）との構造相同性

Cry1F(synpro)及び PAT タンパク質と既知アレルゲンのアミノ酸配列の構造相同性について、Swiss-Prot Protein、Knowledge Base 及び FARRP Protein Allergen Database をもとにコンパイルされたタンパク質アレルゲンデータベース allots version 1.2.0（ダウ・アグロケミカルサイエンス社、2004 年）と探索ソフトウェア FINDERPATTERNS (Version 10.2 of the GCC (Accelrys, Inc., San Diego, CA)) を用いて比較を行った。各タンパク質の連続する 8 つのアミノ酸配列とデータベースに含まれるアレルゲンについて検索を行った結果、相同性は検出されなかった。

さらに、Cry1F(synpro)タンパク質について 80 アミノ酸ずつオーバーラップさせ、全体としての既知アレルゲンとの相同性を探索ソフトウェア GCGFASTA (Version 10.2 of the GCG (Accelrys, Inc., San Diego, CA)) を用いて検索したところ、35%以上の相同性は認められなかった。

また、PAT タンパク質についても同様に、35%以上の相同性は認められていない（参考文献 9）。

(1) ～ (4) 及び前項 3 から総合的に判断し、Cry1F タンパク質及び PAT タンパク質については、アレルギー誘発性を示唆するデータがないことを確認した。

5 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項

cryIF (synpro) 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子の世代間における安定性を確認するために、異なった 2 世代 (BC2F1 及び BC3F4) の DNA サンプルを用いてサザンブロット分析を行った結果、両世代における遺伝子の同一性が確認された。

また、*cryIF*(synpro) 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子の同一世代内形質分離を、サザンブロット及び免疫化学的手法を組み合わせ分析したところ、供試世代 (BC3F2) における *cryIF*(synpro) 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子の分離比の実測値は 3.06 : 0.94 となり、予想比と実測比には二項比例検定による有意差は認められなかった ($P > 0.05$, SAS version 8)。また、タンパク質の発現データとサザンブロット分析の結果には 100%の相関関係が認められた。

6 遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項

Cry1F タンパク質は、植物の代謝経路に影響する酵素ではない。

また、PAT 酵素は基質特異性が極めて高い（参考文献 11）。ホスフィノトリシン関連物質の親和性は極めて低く、また他の親和性を持つ基質はこれまでに報告されていないので、ワタに天然に含まれる物質に PAT タンパク質が反応し、ワタの代謝経路に影響与えることはないと考えられる。

7 宿主との差異に関する事項

ワタ 281 系統と対照の非組換えワタについて、種子及びその加工品（綿実、種皮、綿実ミール及び精製油）の主要組成（タンパク質、脂質、灰分、水分、炭水化物、熱量、粗繊維、酸性デタージェントファイバー：ADF、中性デタージェントファイバー：NDF）を分析し、比較したところ、種子では、ワタ 281 系統と対照ワタの分析値間に有意差 ($P < 0.05$) は認められなかった。加工品における分析値は、対照ワタとの有意差検定はできなかったが、すべて文献値の範囲内であり、また、文献値がない成分ではワタ 281 系統における分析値は対照ワタと近い値であった。

種子、種皮及び綿実ミールの無機成分（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、モリブデン、リン、カリウム、ナトリウム、亜鉛、硫黄）を分析したところ、種子では、カルシウムとマンガン以外の成分では、ワタ 281 系統と対照ワタにおける分析値間に有意差はなかった。ワタ 281 系統におけるカルシウムとマンガンの分析値は、文献値の範囲内であった。ナトリウムは、検出限界の 10mg/100g 以下の分析値が多かった。ワタ 281 系統の種皮及び綿実ミールにおける分析値については、対照ワタとの有意差検定はできなかったが、すべて文献値の範囲内であった。

種子及び綿実ミールのアミノ酸組成（18 種類）を分析したところ、種子では、ワタ 281 系統と対照ワタの間に有意差はなかった。ワタ 281 系統の綿実ミールでは、対照ワタとの有意差検定はできなかったが、10 種類のアミノ酸の分析値は文献値範囲内であり、8 種類のアミノ酸の分析値は文献値の範囲外であったが、対照ワタにおける分析値との差はわずかであった。

種子及び精製油の脂肪酸組成（22 種類）を分析したところ、種子では 6 種類の脂肪酸の分析値においてワタ 281 系統と対照ワタの間に有意差が認められた。そのうち 2 種類については文献値の範囲内であった。残りの 4 種類についてはワタ 281 系統と対照ワタにおける分析値の差は小さく、いずれも文献値より低いものであった。また、ワタ 281 系統の精製油に含まれる脂肪酸の分析値については、対照ワタとの有意差検定はできなかったが、すべて文献値の範囲内であり、文献値がない脂肪酸では対照ワタにおける分析値と近いものであった。

ワタ 281 系統の精製油中のビタミン E（ α -、 β -、 γ - 及び δ - トコフェロール）を分析したところ、対照ワタとの有意差検定はできなかったが、分析値は文献値の範囲内であり、対照ワタにおける分析値と近いものであった。。

種子、綿実、綿実ミール及び精製油中のシクロプロペノイド脂肪酸（マルバリン酸、ステルクリン酸及びジヒドロステルクリン酸）とゴシポール（総ゴシポール及び遊離ゴシポール）を分析したところ、種子では、マルバリン酸以外のシクロプロペノイド脂肪酸の分析値について、ワタ 281 系統と対照ワタの間に有意差は認められなかった。有意差が認められたマルバリン酸のワタ 281 系統における分析値は、文献値の範囲内であった。ワタ 281 系統の精製油に含まれるシクロプロペノイド脂肪酸の分析値は、対照ワタとの有意差検定はできなかったが、すべて文献値の範囲内であった。種子における総ゴシポール量は、ワタ 281 系統と対照ワタの分析値間に有意差は認められなかった。綿実及び綿実ミールの総ゴシポール及び遊離ゴシポール量は、対照ワタとの有意差検定はできなかったが、ワタ 281 系統と対照ワタの分析値が同等であった。さらに精製油中の総ゴシポール及び遊離ゴシポール量は、ワタ 281 系統、対照ワタともに検出限界の 0.002%以下であった。

8 諸外国における認可、食用等

米国農務省は、2003 年 1 月 31 日、ワタ 281 系統、3006 系統及び両者から開発されたワタ系統の申請を受け付け、2004 年 7 月 15 日、これらの系統が栽培規制の対象から除外されることを決定した。

米国食品医薬品局では、2003 年 3 月 13 日、ワタ 281 系統及び 3006 系統の安全性審議を受け付け、それぞれ 2004 年 5 月 5 日及び同年 8 月 3 日に評価が終了した。

米国環境保護局は、2003 年 11 月 3 日、昆虫抵抗性ワタ WideStrike™（ワタ 281 系統とワタ 3006 系統の掛け合わせ品種）の申請を受け付け、2004 年 9 月 30 日、登録を許可した。

メキシコ保健省は、2003 年 7 月 8 日、昆虫抵抗性ワタ WideStrike™（ワタ 281 系統とワタ 3006 系統の掛け合わせ品種）の申請を受け付け、2004 年 9 月 8 日、登録を許可した。

9 栽培方法

ワタ 281 系統と従来のワタの栽培方法の違いは、生育期に除草剤グルホシネートにより影響を受けないこと以外、通常の商用品種と同様である。

10. 種子の製法及び管理方法

ワタ 281 系統の種子の製法と管理方法は、従来のワタと同様である。組換え前の宿主の種子及び組換え後の各世代における種子は、米国インディアナポリスにあるダウ・アグロサイエンス社にて保存されている。

第7 第2から第6までにより安全性の知見が得られていない場合に必要な事項

第2から第6までにより安全性の知見が得られており、次に示された試験は必要ないと判断された。

なお、微生物由来の Cry1F (synpro) タンパク質を用いた急性毒性試験結果が、申請者から参考まで提出されている。

CD-1 マウスに 5%の Cry1F (synpro) タンパク質を含んだ 0.5%メチルセルロース液を 2000mg/kg の割合で 2 回に分けて強制経口投与を行い、2 週間の観察の後に体重測定、臨床症状及び肉眼的病理検査を行ったところ、投与に関連した変化は認められず、CD-1 マウスの LD₅₀ は 2000mg/kg 体重/マウス以上と推定されている。

1. 急性毒性に関する試験
2. 亜急性毒性に関する試験
3. 慢性毒性に関する試験
4. 生殖に及ぼす影響に関する試験
5. 変異原性に関する試験
6. がん原性に関する試験
7. その他必要な試験（腸管毒性試験、免疫毒性試験、神経毒性試験、栄養試験等）

IV 評価結果

遺伝子組換えワタ 281 系統については「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないものと判断された。

V 参考文献

1. FAOSTAT Database. Provisional 2004 production and production indices data. (2004) FAO. Rome.
2. Berardi LC, Goldblatt LA. Gossypol. Toxic Constituents of Plant Foodstuffs. (Ed. IE Liener) (1980) 183-237. Academic Press. New York.
3. Phelps RA, Shenstone FS, Kemmerer AR, Evans RJ. A review of cyclopropenoid compounds: biological effects of some derivatives. *Poultry Science* (1965) 44:93-97.
4. Office of the Gene Technology Regulator. The biology and ecology of cotton (*Gossypium hirsutum*) in Australia. (2002) OGTR. Canberra, Australia.
5. OECD. Draft Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*). Key Food and Feed Nutrients and Anti-Nutrients. (2002) OECD. Brussels.
6. Brehm J, Salmond G, Minton N. Sequence of the adenine methylase gene of the *Streptococcus faecalis* plasmid pAM beta 1. *Nucleic Acid Res.* (1987) 15:3177.
7. Barker RF, Idler KB, Thompson DV, Kemp JD. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology.* (1983) 2:335-350.

8. Dunne EF, Burman WJ, Wilson MJ. Streptomyces pneumonia in a patient with human immunodeficiency virus infection: case report and review of the literature on invasive streptomyces infections. *Clin. Infect. Dis.* (1998) 27:93-96.
9. Hérouet C, Esdaile D, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, Klis RJ, Rouan D. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* (2005) 41:134-149.
10. Wehrman A, Vliet A, Opsomer J, Schulz A. The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology.* (1996) 14:1274-1278.
11. Thompson CJ, Rao Movva N, Tizard R, Crameri R, Davies JE, Lauwerys M, Botterman J. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from Streptomyces hygroscopicus. *EMBO J.* (1987) 6:2519-2523.

遺伝子組換えワタ「ワタ 3006 系統」に係る食品健康影響評価に関する審議結果（案）

I はじめに

食品安全委員会は食品安全基本法に基づき、厚生労働省より、遺伝子組換えワタ 3006 系統（以下、「ワタ 3006 系統」という。）の安全性の審査に係る食品健康影響評価について意見を求められた。（平成 15 年 8 月 1 日、関係書類を接受）

II 評価対象食品の概要

名 称：ワタ 3006 系統

性 質：チョウ目害虫抵抗性、グルホシネート除草剤耐性

申請者：ダウ・ケミカル日本株式会社

開発者：マイコジェン・シード／ダウ・アグロサイエンス社

ワタ 3006 系統は、害虫（チョウ目昆虫）抵抗性の *cryIAc* (synpro : synthetic products の略。以下同じ。) 遺伝子 (*B. t.* 遺伝子) 及び除草剤グルホシネート耐性の改変 *pat* 遺伝子をワタのゲノム中に挿入したものである。

ワタの害虫であるチョウ目のコットンボールワーム、タバコバッドワーム、ピンクボールワームの幼虫に対し高い防除効果を示すとともに、除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育することができるワタである。

なお、ワタ 281 系統*及びワタ 3006 系統を既存の育種手法を用いて掛け合わせ、*cryIF* (synpro)、*cryIAc* (synpro) 及び改変 *pat* 遺伝子の 3 つの遺伝子を有する品種(商品名 : WideStrike™) を作出、商品化することである。

*ワタ 281 系統：害虫（チョウ目昆虫）抵抗性の *cryIF* 遺伝子 (*B. t.* 遺伝子) 及び除草剤グルホシネート耐性の改変 *pat* 遺伝子をワタのゲノム中に挿入して作出された遺伝子組換え系統。

III 食品健康影響評価

第 1 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相違に関する事項

1 宿主及び導入 DNA に関する事項

(1) 宿主の種名及び由来

ワタ 3006 系統の宿主として用いられたワタは、Malvales 目、Malvaceae 科、*Gossypium* 属、*hirsutum* 種の GC510 系統である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

ワタ 3006 系統に導入された *cryIAc* (synpro) 遺伝子は、*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* 由来であり、植物に導入しやすいよう一部改変されたものである。ワタ 3006 系統に導入された、改変 *pat* 遺伝子は、*Streptomyces viridochromogenes* 由来で、植物用に最適化された合成グルホシネート耐性遺伝子である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

cry1Ac (synpro) 遺伝子はチョウ目害虫を防除するタンパク質をコードする。改変 *pat* 遺伝子はグルホシネート・アンモニウムへの耐性を付与するもので、戻し交雑における選択マーカーとして利用した。これらの遺伝子をアグロバクテリウム法により導入した。

2 宿主の食経験に関する事項

ワタは主に繊維作物として栽培されているが、収穫されたワタの綿実から繊維が除かれ、綿実油が搾油される。宿主の食用としての利用は綿実油のみであり、綿実油は、揚げ油、サラダ油、料理用油、マヨネーズ、サラダドレッシング、マーガリンなどに広く用いられている。綿実油は、日本人の年間総食品消費量のうちの 0.012% を占めている（参考文献 1）。

3 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項

（1）宿主の可食部分の主要栄養素等（タンパク質、脂質等）の種類及びその量の概要

宿主の可食部分である綿実の主要成分組成（乾燥重量%）は、タンパク質 27.6%、脂質 22.6%、灰分 4.0% 及び炭水化物 45.8% である。

（2）宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質（栄養素の吸収等を阻害する物質。例えば、トリプシンインヒビター、フィチン酸等）等の種類及びその量の概要

宿主であるワタには、ゴシポールと呼ばれるテルペノイド物質とシクロプロペン脂肪酸が含まれる。なお、ワタ乾燥種子重量当たりのゴシポールの含有率は、0.19~1.7% である（参考文献 2）が、ゴシポールは、綿実油の加工過程の加熱及びアルカリ処理で取り除かれる。また、シクロプロペン脂肪酸は、搾油工程における脱臭処理によって綿実油中の含有量が著しく減少する（参考文献 3）。

4 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項

ワタ 3006 系統と既存種の食品としての利用は、いずれも綿実油であり、利用方法において差異はない。

（1）収穫時期（成熟程度）と貯蔵方法

戻し交雑に使用した非組換えワタ（商業品種：PSC355 系統）と、ワタ 3006 系統について栽培試験を実施し、生育及び形態を記録したところでも、ワタ 3006 系統の生育及び形態上の特質は非組換えワタと変わりはない。なお、貯蔵方法においても、組換えワタと非組換えワタで変わりはない。

（2）摂取（可食）部位

ワタ由来の食品は綿実油であり、組換えワタと非組換えワタで変わりはない。

（3）摂取量

食品としての綿実油は、マヨネーズやマーガリン等に使用されているものも含め、日本人の総食品消費量のうち 0.012% を占めている。

（4）調理及び加工方法

ワタ 3006 系統と非組換えワタの加工の方法には変わりはない。綿実油は、揚げ油、サラダ油、料理用油、マヨネーズ、サラダドレッシング、マーガリンなどに用いられる。

5 宿主以外のものを比較対象に追加している場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項

宿主以外のものは比較対象としていない。

6 安全性評価において検討が必要とされる相違点

ワタ 3006 系統では、*cry1Ac* (synpro) 遺伝子、改変 *pat* 遺伝子が導入され、Cry1Ac(synpro) タンパクと PAT タンパクが産生されていることが、宿主との相違点である。

以上、1～6 により、ワタ 3006 系統の安全性評価においては、既存のワタとの比較が可能であると判断された。

第2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

ワタ 3006 系統に組み込まれた *cry1Ac* (synpro) 遺伝子、Cry1Ac タンパク質を産生し、チョウ目昆虫の幼虫による食害を防止することが可能になる。

さらに、ワタ 281 系統とワタ 3006 系統を交雑し、商品化することにより、さらに幅広くワタ害虫を防除することが可能となることである。

第3 宿主に関する事項

1 分類学上の位置付け（学名、品種名及び系統名等）

宿主には、*Gossypium hirsutum* 種の GC510 系統が用いられた。

2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯

ワタの原産地は、主に熱帯及び亜熱帯の比較的乾燥した地域と考えられている。

今日、一般に栽培されているワタは *Gossypium* 属の 50 種のうち 4 種であり、このうち、*G. hirsutum* L. が最も広く栽培されている。

ワタの育種は、主に綿花の繊維の品質向上のために行われてきた歴史があり、ワタが元来含有するゴシポールとシクロプロペン脂肪酸の生産を低下・消失させるための育種は特別行われてこなかったものと思われる。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

ワタには、ゴシポールと呼ばれるテルペノイド物質、また、シクロプロペン脂肪酸といった有害成分が含まれている。

ワタ種子に含まれるゴシポール及び関連テルペノイド群の含有レベルは、品種及び環境条件により異なっているが、綿実油の加工過程の加熱及びアルカリ処理でゴシポールは取り除かれ、シクロプロペン脂肪酸は、油の脱臭、漂白精製工程により、その含有量は大幅に減少する。

4 アレルギー誘発性に関する事項

ワタについては、ワタを加工する工場の従業員が、ワタくずを吸い込むことにより喘息のような症状が現れることが知られているが（参考文献 4）、食用となる綿実油については、タンパク質を含んでおらず、また、ワタは風媒花ではないため、花粉がアレルギーの原因となる可能性は極めて低い。

5 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項

ワタに感染する植物ウイルスは存在するが、それらのうち、ヒトや動物に感染する能力があるものは知られていない。

6 安全な摂取に関する事項

綿実油の精製方法は一般に種子から種皮を取り除き、種皮の取れた種をローラーで挽き、その後加熱して細胞壁を壊し、油の粘度を低め、綿実油を抽出するとともに、途中の加熱工程でゴシポールが取り除かれている。更なる精製加工過程（脱臭、漂白）でシクロプロペノイド脂肪酸量も減少するため問題とはならない。また、食用となる精製綿実油からは、通常、タンパク質は検出されない（参考文献5）。

7 近縁の植物種に関する事項

ワタには有害生理活性物質を生産する近縁種は知られていない。

第4 ベクターに関する事項

1 名称及び由来に関する事項

ワタ 3006 系統の形質転換に用いられたプラスミドベクターpMYC3006 の基となったベクターは、RK2 由来の p DAS 1 である。本ベクターについては、RK2 プラスミド由来のテトラサイクリン耐性遺伝子の代わりに *Streptococcus faecalis* プラスミド pAM beta（参考文献6）由来のエリスロマイシン耐性遺伝子のコード配列が挿入されている他、RK2 由来の複製基点 Ori 遺伝子と転写抑制遺伝子 *trfA* 及び *Rhizobium radiobacter* (*A. tumefaciens*) 由来の pTi5955（参考文献7）の T-DNA 境界配列が含まれている。

2 性質に関する事項

p DAS 1 の塩基数は 7,550bp である。また、本ベクターの構成遺伝子の特性も明らかとなっている。

第5 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

1. 挿入 DNA の供与体に関する事項

（1）名称、由来及び分類に関する事項

cryIAc(synpro) 遺伝子は、*B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD73 に由来の植物用に最適化された遺伝子である。

改変 *pat* 遺伝子は、*S. viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子をもとに合成されたものである。

（2）安全性に関する事項

cryIAc (synpro) 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* について、WHO の化学安全国際プログラム (IPCS) による環境健康基準報告書は、「飲料水または食品に存在する *B. t.* 菌がヒトの健康に対する有害性となる記録はない」と結論している。また、哺乳類の腸細胞表面には、*cryIAc* (synpro) 遺伝子にエンコードされたデルタエンドトキシンとの結合部位はないことから、家畜やヒトがこのタンパク質の影響を受けることはない。

改変 *pat* 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* は、土壌に一般に生息する好気性の放線菌であり、極めて軽微なストレプトマイシン感受性を持つが、ヒト、動物及び植物に対する不都合な影響については報告されていない。また、ヒトへの病原性はなく、毒素の産生のようなヒトに対する健康上の影響は知られていない。

2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む）及びその遺伝子産物の性質

（1）挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項

ワタ 3006 系統に導入された *cry1Ac*(synpro) 遺伝子は、*B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD73 から単離された。挿入 DNA の遺伝要素は表のとおりであり、制限酵素による切断地図、機能等は明らかとなっている。

・ワタ 3006 系統への挿入 DNA

略称	機 能
UbiZml (イトロシ 1)	トウモロコシ <i>Zea mays</i> のユビキチン 1 プロモーター。
<i>cry1Ac</i> (synpro)	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> 由来の植物用に最適化された遺伝子。コアトキシン <i>Cry1Ac</i> (core)、 <i>Cry1Ca3</i> と <i>Cry1Ab</i> の一部をコードする。
ORF25Poly-A	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) pTi15955 (GenBank Locus ATACH5, Accession number X00491) 由来の双方向ターミネーター。
改変 <i>pat</i>	<i>S. viridochromogenes</i> 由来のフォスフィトリシ・アセトランスフェラーゼ 遺伝子配列に基づき、植物用に最適化された合成グリホサート耐性遺伝子。
(4ocs)Delta-Mas2'	pTiAch5 由来のオクトリン合成酵素のエンハンサーを 4 コピー含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) pTi15955 (GenBank Locus ATACH5, Accession number X00491) 由来のモノリン合成酵素のプロモーター。

（2）塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

ワタ 3006 系統に導入しようとする T-DNA の挿入部分の塩基数は 8,421bp であり、制限酵素による切断地図も明らかになっている。

（3）挿入遺伝子の機能に関する事項

cry1Ac (synpro) 遺伝子は、ワタの害虫であるチョウ目昆虫を防除するタンパク質をコードしており、改変 *pat* 遺伝子は選抜マーカーとして用いられる除草剤耐性遺伝子である。

（4）抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

T-DNA 領域に抗生物質耐性マーカー遺伝子は含まれていない。なお、発現ベクター pMYC3006 に組み込まれたエリスロマイシン耐性遺伝子は、T-DNA 領域外にある。

3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域

（1）プロモーターに関する事項

cry1Ac(synpro) 遺伝子のプロモーターは、トウモロコシのユビキチンプロモーターである。

改変 *pat* 遺伝子のプロモーターは *R. radiobacter*(*A. tumefaciens*) 由来の (4ocs)Delta-Mas2' プロモーターである。

（2）ターミネーターに関する事項

cryIac(synpro)遺伝子のターミネーターは、*R. radiobacter*(*A. tumefaciens*)の ORF25 が発する両方向のポリ A 化シグナルである。

改変 *pat* 遺伝子のターミネーターも同じである。

- (3) その他、挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列を組み込んだ場合には、その由来、性質等が明らかであること

上記プロモーター、ターミネーター以外に挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列は導入されていない。

4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法

ワタ 3006 系統の作出に用いられた発現ベクター pMYC3006 は、PK2 由来の T-DNA バイナリープラスミドの T-DNA 境界配列間に、改変 *pat* 遺伝子を発現するための配列（〔(4ocs)Delta-Mas2'〕－〔改変 *pat*〕－〔ORF25Poly-A〕）配列を挿入し、さらに、ORF25Poly-A 配列と T-DNA 領域境界 A との間に、*cryIac* (synpro) 遺伝子を発現するための配列（〔UbiZml〕－〔*CryIac*(synpro)〕）を挿入して構築された。

5. 構築された発現ベクター

- (1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図

ワタ 3006 系統は、発現ベクター pMYC3006 を用いて作出された。

発現ベクター pMYC3006 の塩基数は 15,337bp である。また、制限酵素による切断地図は明らかとなっている。

- (2) 原則として、最終的に構築された発現ベクターには、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないこと

構築された発現ベクターには、*CryIac*(synpro) 及び PAT タンパク質以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームは含まれていない。

- (3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が発現ベクター上で明らかであること

ワタ 3006 系統は、発現ベクター pMYC3006 を用いて、アグロバクテリウム法により作出されたものであるが、*cryIac*(synpro) 及び改変 *pat* 遺伝子のコード配列とともに、ワタにおけるこれら遺伝子の発現に必要な調節要素を含む挿入領域（T-DNA 領域）は、発現ベクター上で明らかとなっている。

- (4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること
発現ベクター pMYC3006 の各要素は純化され、T-DNA 領域に目的外の遺伝子は含まない。

6 DNA の宿主への導入方法及び交配

ワタ 3006 系統は、発現ベクター pMYC3006 を用い、宿主であるワタ GC510 系統をアグロバクテリウム法によって形質転換したものである。

試験管内で発芽したワタ GC510 系統の子葉部分を、生育 7 日～10 日目の苗から切り離し、発現ベクター pMYC3006 を含む非病原性の *R. radiobacter*(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 株と共に培養した。共培養の後、処理した子葉部分をグルホシネート・アンモニウムが含まれたカルス形成誘発培地に移した。得られたカルス組織を、さらにグルホシネート・アンモニウムを含む

選択培地で培養し、その後、幼胚誘発培地に移して再分化させた。発根した苗木を殺菌土壌に植え替え、環境順応させるとともに、組換え体の標的害虫（コットンボールワーム）に対する耐性を葉片ディスクを使った生物検定により確認し、ワタ 3006 系統を得た。

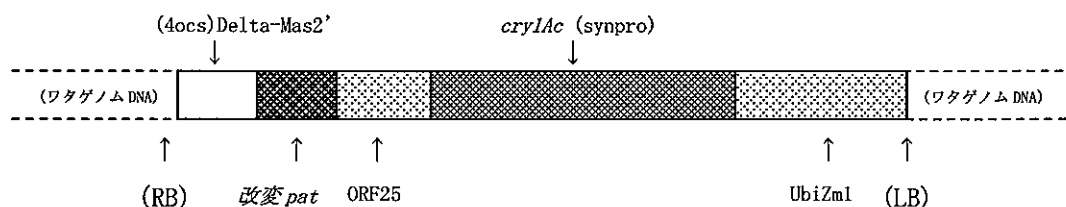
第6 組換え体に関する事項

1 遺伝子導入に関する事項

(1) コピー数及び挿入近傍配列

導入遺伝子のコピー数の解明、各 DNA 配列の構成と挿入を確認するためにサザンブロット分析と挿入 DNA のクローニングおよび塩基配列の決定を行った結果、ワタ 3006 系統には、Cry1Ac(synpro)及び PAT タンパク質を発現する遺伝子カセットの完全な 1 コピーが単一の遺伝子座に挿入されていることが示された。また、サザンブロット分析により、発現ベクター pMYC3006 のバックボーン配列は導入されていないことが確認された。なお、挿入近傍配列も明らかとなっている。

・ワタ 3006 系統に挿入された DNA (模式図)



(2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

挿入 DNA 及び隣接境界領域の塩基配列分析により、目的とする以外のタンパク質を発現する可能性のある新しいオープンリーディングフレームは同定されなかった。また、実際に挿入された T-DNA 領域の塩基配列は完全に一致することが確認された。

2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

Cry1F タンパク質の発現時期と発現量については、全ての生育時期の若葉、花及び綿実さや中で検出されたが、PAT タンパク質は若葉以外では検出されなかった。

発現部位と発現量については、Cry1Ac(synpro) タンパク質の平均含有量は、根の 0.05ng/mg (乾燥重量当たり。以下同じ) 以下から、若葉のサンプルにおける 1.92ng/mg の範囲で検出され、種子中の発現量は平均 0.57ng/mg であった。

また、PAT タンパク質の発現量は ND から 0.11ng/mg の範囲であり、種子中の発現量は 0.06 ng/mg (検出限界：0.001-0.4ng/mg) であった。

3 遺伝子産物 (タンパク質) が一日タンパク摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項

綿実、種皮、綿実ミール及び精製油について ELISA 分析を行ったところ、Cry1Ac(synpro) タンパク質及び PAT タンパク質は検出されなかったことから、ワタ 3006 系統由来の精製された綿実油や綿実油を含む食品の摂取による Cry1Ac(synpro) タンパク質及び PAT タンパク質のヒトへの予測される曝露は検出限界以下であることがわかった。

なお、ヒトが摂取するワタ産物は綿実油であり、綿実油中からはタンパク質は検出されない。

4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギ－誘発性に関する事項

- (1) 挿入遺伝子の供与体（抗生物質耐性マーカー遺伝子供与体も含む）のアレルギ－誘発性（グルテン過敏性腸炎誘発性を含む）に関する知見が明らかにされていること

cry1Ac(core)遺伝子は、*B. thuringiensis* var. *kurstaki*に由来する。*B. thuringiensis* (*B. t.*) は60年以上もの間、害虫防除のために使用され、その使用の歴史や哺乳類でのテスト（経口摂取暴露による病原菌のテストを含む）及び伝染病学上の研究により、ヒトへの安全性は確立されている。

改変 *pat* 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* は、土壌に生息する一般的な好気性放線菌の一種である。*Streptomyces* 属菌はヒトの病気の原因になることは少ないが、皮膚及び皮下組織の局所的な慢性的化膿性の感染症に見られることがある（参考文献8）。

これらの供与体にアレルギ－誘発性があるとの報告は知られていない。

- (2) 遺伝子産物（タンパク質）についてそのアレルギ－誘発性に関する知見が明らかにされていること

Cry1Ac(synpro)タンパク質及びPATタンパク質については、いずれも、ヒトに対するアレルギ－誘発性を有するという報告はない。

なお、ヒトが摂取するワタ3006系統由来の食品は綿実油のみであり、タンパク質はその精製過程において分離され、精製油に含まれることはない。

- (3) 遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

遺伝子組換え *Pseudomonas fluorescens* MR1620株由来のCry1Ac(synpro)タンパク質及び *Escherichia coli* 発現システムにより産生されたPATタンパク質を用いて、以下の試験が行われた。

なお、試験に用いられた組換え微生物（MR1620株）由来のCry1Ac(synpro)タンパク質は、アミノ酸配列分析、SDS-PAGE、ウェスタンブロット、N末端配列解析、MALDI-TOF質量分析から、ワタ3006系統に発現するCry1Ac(synpro)タンパク質と生化学的、構造的及び機能的に同等であることが確認されている。

①人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理

Cry1Ac(synpro)タンパク質を、ペプシンを含む人工胃液（SGF）に加え、0～30分間処理したところ、Cry1Ac(synpro)タンパク質はSGF内で1分以内に消化された。

また、PATタンパク質を、ペプシンを含む人工胃液（SGF）に加え、0.5～60分間処理したところ、PATタンパク質は30秒以内に消化された。

②人工腸液によるアルカリ処理及び酵素（パンクレアチン）処理

Cry1Ac(synpro)タンパク質を、約1%（w/v）のパンクレアチンを含む人工腸液（SIF）に加えたところ、Cry1Ac(synpro)タンパク質は、SIF中で耐トリプシンのコアトキシシンまで速やかに消化されたが、コアトキシシンはSIF中で4時間後でも消化されなかった。

また、PAT タンパク質は、パンクレアチンを含む SIF で 30 秒以内に消化されることが明らかにされている（参考文献 9）。

③加熱処理

Cry1Ac(synpro)タンパク質を 90℃で 30 分間加熱処理し、SDS-PAGE 及び ELISA 法により、分子量及び酵素活性を見たところ、分子量は 90℃、30 分間の加熱で変化しなかったが、酵素活性は 99%以上失活していることが確認された。

また、PAT タンパク質は、90℃で 60 分間加熱処理しても、分子量に変化がないことが明らかにされているが（参考文献 9）、55℃で 10 分間の加熱処理により酵素活性が失活することが確認されている（参考文献 10）。

(4) 遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲン（グルテン過敏性腸疾患に関与するタンパク質を含む）との構造相同性

Cry1Ac(synpro)及び PAT タンパク質と既知アレルゲンのアミノ酸配列の構造相同性について、Swiss-Prot Protein、Knowledge Base 及び FARRP Protein Allergen Database をもとにコンパイルされたタンパク質アレルゲンデータベース allots version 1.2.0（ダウ・アグロケミカルサイエンス社、2004 年）と探索ソフトウェア FINDERPATTERNS（Version 10.2 of the GCC（Accelrys, Inc., San Diego, CA））を用いて比較を行った。各タンパク質の連続する 8 つのアミノ酸配列とデータベースに含まれるアレルゲンについて検索を行った結果、相同性は検出されなかった。

さらに、Cry1Ac(synpro)タンパク質について 80 アミノ酸ずつオーバーラップさせ、全体としての既知アレルゲンとの相同性を探索ソフトウェア GCGFASTA（Version 10.2 of the GCG（Accelrys, Inc., San Diego, CA））を用いて検索したところ、35%以上の相同性は認められなかった。

また、PAT タンパク質についても同様に、35%以上の相同性は認められていない（参考文献 9）。

(1) ～ (4) 及び前項 3 から総合的に判断し、Cry1Ac タンパク質及び PAT タンパク質については、アレルギー誘発性を示唆するデータがないことを確認した。

5 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項

cry1Ac(synpro)遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子について、世代間における安定性を確認するために、異なった 2 世代（BC3F1 及び BC3F4）の DNA サンプルを用いてサザンブロット分析を行った結果、両世代における遺伝子の同一性が確認された。

また、*cry1Ac*(synpro)遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子の同一世代内形質分離を、サザンブロット及び免疫化学的手法を組み合わせ分析したところ、供試世代（BC3F2）における *cry1Ac*(synpro)遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子の分離比の実測値は 3.36 : 0.64 となり、予想比と実測比には二項比例検定による有意差は認められなかった（ $P>0.05$ 、SAS version 8）。また、タンパク質の発現データとサザンブロット分析の結果には 100%の相関関係が認められた。

6 遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項

Cry1Ac タンパク質は、植物の代謝経路に影響する酵素ではない。

また、PAT 酵素は基質特異性が極めて高い（参考文献 11）。ホスフィノトリシン関連物質の親和性は極めて低く、また他の親和性を持つ基質はこれまでに報告されていないので、ワタに天然に含まれる物質に PAT タンパク質が反応し、ワタの代謝経路に影響与えることはないと考えられる。

7 宿主との差異に関する事項

ワタ 3006 系統と対照の非組換えワタについて種子及びその加工品（綿実、種皮、綿実ミール及び精製油）の主要組成（タンパク質、脂質、灰分、水分、炭水化物、熱量、粗繊維、酸性デタージェントファイバー：ADF、中性デタージェントファイバー：NDF）を分析・比較したところ、種子では、脂質及び粗繊維以外の成分について、ワタ 3006 系統と対照ワタの分析値間に有意差は認められなかった。有意差が認められた脂質及び粗繊維のワタ 3006 系統における分析値は文献値の範囲内であった。加工品の分析値は、対照ワタとの有意差検定はできなかったが、すべて文献値の範囲内であり、また、文献値がない成分ではワタ 3006 系統における分析値は対照ワタと近い値であった。

種子、種皮及び綿実ミールの無機成分（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、モリブデン、リン、カリウム、ナトリウム、亜鉛、硫黄）と、種子全体及び綿実ミールのアミノ酸組成（18 種類）を分析したところ、ワタ 3006 系統と対照ワタの種子における分析値間に有意差はなかった。また、ナトリウムは、検出限界の 10mg/100g 以下の分析値が多かった。種皮及び綿実ミールにおける分析値については、対照ワタとの有意差検定はできなかったが、すべて文献値の範囲内であった。

種子及び綿実ミールのアミノ酸組成（18 種類）を分析したところ、種子における分析値ではワタ 3006 系統と対照ワタの間に有意差はなかった。綿実ミールでは、対照ワタとの有意差検定はできなかったが、8 種類のアミノ酸の分析値が文献値の範囲内であり、文献値の範囲外のアミノ酸については、ワタ 3006 系統と対照ワタにおける分析値との差はわずかであった。

種子及び精製油の脂肪酸組成（22 種類）を分析したところ、種子では 3 種類の脂肪酸の分析値においてワタ 3006 系統と対照ワタの間に有意差が認められた。そのうち 1 種類については文献値の範囲内であった。残りの 2 種類についてはワタ 3006 系統と対照ワタにおける分析値の差は小さく、いずれも文献値より低いものであった。また、精製油に含まれる脂肪酸の分析値については、対照ワタとの有意差検定はできなかったが、すべて文献値の範囲内であり、文献値がない脂肪酸では対照ワタにおける分析値と近いものであった。

精製油中のビタミン E（ α -、 β -、 γ - 及び δ - トコフェロール）を分析したところ、対照ワタとの有意差検定はできなかったが、分析値は文献値の範囲内であり、対照ワタにおける分析値と近いものであった。

種子、綿実、綿実ミール及び精製油中のシクロプロペノイド脂肪酸（マルバリニン酸、ステルクリン酸及びジヒドロステルクリン酸）とゴシポール（総ゴシポール及び遊離ゴシポール）を分析したところ、種子では、ジヒドロステルクリン酸の分析値について、ワタ 3006 系統と対照ワタの間に有意差は認められなかった。有意差が認められたステルクリン酸及びマルバリニン酸のワタ 3006 系統における分析値は、文献値の範囲内であった。精製油中のシクロプロペノイド脂肪酸の分析値は、

対照ワタとの有意差検定はできなかったが、すべて文献値の範囲内であった。種子中の総ゴシポール量は、ワタ 3006 系統と対照ワタにおける分析値間で有意差は認められなかった。綿実及び綿実ミールにおける総ゴシポール及び遊離ゴシポール量は、対照ワタとの有意差検定はできなかったが、ワタ 3006 系統と対照ワタの分析値間で同等であった。さらに、精製油中の総ゴシポール量及び遊離ゴシポール量は、ワタ 3006 系統、対照ワタともに検出限界の 0.002%以下であった。

8 諸外国における認可、食用等

米国農務省は、2003 年 1 月 31 日、ワタ 3006 系統、281 系統及び両者から開発されたワタ系統の申請を受け付け、2004 年 7 月 15 日、これらの系統が栽培規制の対象から除外されることを決定した。

米国食品医薬品局では、2003 年 3 月 13 日、ワタ 3006 系統及び 281 系統の安全性審議を受け付け、それぞれ 2004 年 5 月 5 日及び同年 8 月 3 日に評価が終了した。

米国環境保護局は、2003 年 11 月 3 日、昆虫抵抗性ワタ WideStrike™ (ワタ 3006 系統とワタ 281 系統の掛け合わせ品種)の申請を受け付け、2004 年 9 月 30 日、登録を許可した。

メキシコ保健省は、2003 年 7 月 8 日、昆虫抵抗性ワタ WideStrike™ (ワタ 3006 系統とワタ 281 系統の掛け合わせ品種)の申請を受け付け、2004 年 9 月 8 日、登録を許可した。

9 栽培方法

ワタ 3006 系統と従来のワタの栽培方法の違いは、生育期に除草剤グルホシネートにより影響を受けないこと以外、通常の商用品種と同様である。

10. 種子の製法及び管理方法

ワタ 3006 系統の種子の製法と管理方法は、従来のワタと同様である。組換え前の宿主の種子及び組換え後の各世代における種子は、米国インディアナポリスにあるダウ・アグロサイエンス社にて保存されている。

第 7 第 2 から第 6 までにより安全性の知見が得られていない場合に必要な事項

第 2 から第 6 までにより安全性の知見が得られており、次に示された試験は必要ないと判断された。

なお、微生物由来の Cry1Ac (synpro) タンパク質を用いた急性毒性試験結果が、申請者から参考まで提出されている。

CD-1 マウスに 10%の Cry1Ac (synpro) タンパク質を含んだ 0.5%メチルセルローズ液を 5000mg/kg の割合で 2 回に分けて強制経口投与を行い、2 週間の観察の後に体重測定、臨床症状及び肉眼的病理検査を行ったところ、投与に関連した変化は認められず、CD-1 マウスの LD₅₀ は 5000mg/kg 体重/マウス以上と推定されている。

1. 急性毒性に関する試験
2. 亜急性毒性に関する試験
3. 慢性毒性に関する試験
4. 生殖に及ぼす影響に関する試験

5. 変異原性に関する試験
6. がん原性に関する試験
7. その他必要な試験（腸管毒性試験、免疫毒性試験、神経毒性試験、栄養試験等）

IV 評価結果

遺伝子組換えワタ 3006 系統については「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないものと判断された。

V 参考文献

1. FAOSTAT Database. Provisional 2004 production and production indices data. (2004) FAO. Rome.
2. Berardi LC, Goldblatt LA. Gossypol. Toxic Constituents of Plant Foodstuffs. (Ed. IE Liener) (1980) 183-237. Academic Press. New York.
3. Phelps RA, Shenstone FS, Kemmerer AR, Evans RJ. A review of cyclopropenoid compounds: biological effects of some derivatives. *Poultry Science* (1965) 44:93-97.
4. Office of the Gene Technology Regulator. The biology and ecology of cotton (*Gossypium hirsutum*) in Australia. (2002) OGTR. Canberra, Australia.
5. OECD. Draft Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*). Key Food and Feed Nutrients and Anti-Nutrients. (2002) OECD. Brussels.
6. Brehm J, Salmond G, Minton N. Sequence of the adenine methylase gene of the *Streptococcus faecalis* plasmid pAM beta 1. *Nucleic Acid Res.* (1987) 15:3177.
7. Barker RF, Idler KB, Thompson DV, Kemp JD. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology.* (1983) 2:335-350.
8. Dunne EF, Burman WJ, Wilson MJ. *Streptomyces pneumonia* in a patient with human immunodeficiency virus infection: case report and review of the literature on invasive streptomyces infections. *Clin. Infect. Dis.* (1998) 27:93-96.
9. Hérouet C, Esdaile D, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, Kliš RJ, Rouan D. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* (2005) 41:134-149.
10. Wehrman A, Vliet A, Opsomer J, Schulz A. The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology.* (1996) 14:1274-1278.
11. Thompson CJ, Rao Movva N, Tizard R, Crameri R, Davies JE, Lauwerys M, Botterman J. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* (1987) 6:2519-2523.